



Prof. dr hab. Grzegorz Rosiński
Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Michaliny Kazek
„Wpływ metabolitów wytwarzanych przez entomopatogenny grzyb *Conidiobolus coronatus* na wybrane procesy fizjologiczne stawonogów”

Wśród najliczniejszej grupy zwierząt na świecie – owadów występuje szereg gatunków wywierających szkodliwy wpływ na gospodarkę i zdrowie człowieka. Od dłuższego już czasu w walce ze szkodliwymi owadami stosowane są różnego rodzaju syntetyczne pestycydy fosforoorganiczne, karbaminiany, pyretroidy czy chlorowane węglowodory, które choć są skuteczne owadobójczo, to jednak wywołują negatywne skutki w środowisku, są trudno biodegradowalne, a obecnie ponad 500 gatunków szkodliwych owadów wykształciło już na nie wysoką oporność. Walka ze szkodliwymi owadami opornymi na klasyczne insektycydy generuje coraz większe koszty. Przykładowo, tylko w ostatnich latach na zwalczanie larw komarów corocznie wydatkowanych jest około 2 miliardów dolarów, nie licząc już ogromnych kosztów związanych z leczeniem ludzi. Wobec pojawienia się negatywnych skutków działania syntetycznych pestycydów poszukuje się alternatywnych, bardziej bezpiecznych i gatunkowo selektywnych metody kontroli szkodników owadzych, na przykład przy wykorzystaniu jako bioinsektycydy peptydomimetyków lub zastosowaniu jako naturalnych insektycydów bakterii, wirusów czy grzybów entomopatogennych. Obecnie badania te mają duże znaczenie innowacyjne i potencjalnie aplikacyjne.

W ten kierunek badań związanych z poszukiwaniem nowych naturalnych preparatów owadobójczych wpisuje się właśnie rozprawa doktorska mgr Michaliny Kazek wykonana pod kierunkiem prof. Mieczysławy Boguś w tutejszym Instytucie Parazytologii Polskiej Akademii



Nauk. W przyjętej formule badawczej w rozprawie założono podejście kompleksowego zbadania oddziaływania metabolitów wytwarzanych przez grzyb *Conidiobolus coronatus* na wybrane procesy fizjologiczne kilku przedstawicieli stawonogów, głównie owadów i kleszcza.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej pt. „Wpływ metabolitów wytwarzanych przez entomopatogeny grzyb *Conidiobolus coronatus* na wybrane procesy fizjologiczne stawonogów” mgr Michalina Kazeł zidentyfikowała wśród wyizolowanych z grzyba 77 metabolitów dwa związki - alkohol benzylowy i dodekanol o wysokiej aktywności owadobójczej oraz wykonała szeroką analizę ich pleiotropowego działania fizjologicznego w różnych kombinacjach eksperymentalnych na poziomie tkankowym, komórkowym i biochemicznym u modelowych gatunków owadów.

Podjęta przez Autorkę w pracy doktorskiej problematyka badawcza jest w swoim założeniu oryginalna i ma istotne znaczenie dla opracowania nowych preparatów owadobójczych. Znaczenie naukowe tej rozprawy polega nie tylko na określeniu wagi samego problemu badawczego, ale i na poznaniu selektywności gatunkowej i specyfiki mechanizmów toksycznego oddziaływania testowanych metabolitów na zdolności obronne owadów w zakresie funkcji pełnionych przez kutikulę i układ immunologiczny. Przy wyznaczaniu zasadniczych celów badawczych Doktorantka sformułowała poprawnie odpowiednie założenia badawcze, które w dalszej części pracy w rozdziale Dyskusja poddała szczegółowej analizie.

Zasadniczy problem, jak i główne cele badawcze Doktorantka sformułowała na podstawie wcześniejszego, gruntownego zapoznania się z dotychczasową literaturą fachową dotyczącą tego zakresu tematyki, co dokładnie opisała we Wstępie rozprawy. W mojej opinii idea podjęcia badań prezentowanych w ramach tej rozprawy doktorskiej była w pełni uzasadniona i została dobrze udokumentowana potrzebą uzupełnienia istniejących luk w aktualnej wiedzy z zakresu sformułowanego tematu, zwłaszcza ze względu na potrzebę dokładniejszego poznania mechanizmów toksycznego działania metabolitów *C. coronatus* na funkcje obronne owadów. Pod względem merytorycznym przedstawiony zakres badań, jak i uzyskane wyniki w rozprawie są zgodne ze sformułowanym tytułem oraz wyznaczonymi głównymi celami i szczegółowymi zadaniami i mieszczą się w ramach wyznaczonej problematyki badawczej.



Mgr Michalina Kazek swoją rozprawę doktorską przygotowała według klasycznego schematu przyjętego dla opracowań prac eksperymentalnych. Całość rozprawy została zamieszczona łącznie na 168 stronach, na których oprócz tekstu przedstawione zostały poglądowe schematy oraz duża liczba rycin i tabel z uzyskanych wyników badań. Przygotowując starannie tak obszerny materiał do manuskryptu Doktoranta zapewne włożyła dużo pracy przy jego opracowaniu, co z mojej strony zasługuje na uznanie. W strukturze rozprawy zostały wyróżnione podstawowe rozdziały, tj. Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Posumowanie i Wnioski oraz spis cytowanej Literatury, obejmujący łącznie 203 pozycje. Na początku rozprawy Doktorantka dodatkowo dołączyła Streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzające czytelnika w całość analizowanej problematyki, jak i pokazujące dokonane osiągnięcia badawcze w tej pracy.

Praca napisana jest przystępnym językiem i podczas jej lektury nie znalazłem nadmiernie rozwlekłych fragmentów lub merytorycznie mało istotnych dla omawianych zagadnień i pod tym względem stanowi zwartą formę, w której zachowane są odpowiednie proporcje objętości tekstu odnoszące się do przedstawionej problematyki badawczej, opisu metod, uzyskanych wyników i ich dyskusji oraz wyciągniętych wniosków.

Istotnym walorem przedstawionej mi do oceny rozprawy jest niewątpliwie dobrze zaprezentowany we Wstępie przegląd aktualnej wiedzy na temat stosowania środków owadobójczych, w tym grzybów entomopatogennych i ich potencjalnego wykorzystania, mechanizmu infekcji grzybowej, fizjologicznych mechanizmów obronnych u owadów, indukcji stresu oksydacyjnego i typów programowanej śmierci komórkowej. Odnośnie do całości tych zagadnień Doktorantka prześledziła bogate piśmiennictwo, często najnowsze, dokonała gruntownej analizy aktualnego stanu wiedzy na ten temat i przygotowała interesującą część pracy, która po drobnych skróceniach nadaje się do publikacji w formie artykułu przeglądowego. Szeroka analiza wymienionych zagadnień przeprowadzona przez Doktorantkę we Wstępie pozwoliła na sformułowanie merytorycznie poprawnych głównych celów i szczegółowych zadań badawczych.

Podczas realizacji zaplanowanych doświadczeń w rozprawie mgr Michalina Kazek zastosowała szereg właściwie dobranych biotestów fizjologicznych i nowoczesnych metod



badawczych, pozwalających na określenie selektywności gatunkowej i specyfiki mechanizmów toksycznego działania grzyba i jego aktywnych metabolitów u modelowych gatunków owadów. Zastosowanie przez Doktorantkę technik hodowli kilku gatunków owadów, biotestów toksykologicznych *in vivo* i *in vitro*, procedur histologicznych, metod immunohistochemicznych, analizy wolnych kwasów tłuszczowych techniką GC/MS, hodowli *in vitro* komórek owadzych czy testów do wykrywania apoptozy/nekrozy i pomiaru aktywności enzymów stresu oksydacyjnego w mojej ocenie jest godne zauważenia, gdyż pokazuje wielostronne opanowanie nowoczesnego warsztatu pracy przez Autorkę w zakresie eksperymentów fizjologicznych i toksykologicznych. Podobnie, sposób przeprowadzania anestezji, pobierania hemolimfy oraz izolacja tkanki ciała tłuszczowego i cewek Malpighiego do badań wskazują, że opanowała Ona również precyzyjne wykonywanie procedur mikrochirurgicznych. Chciałbym w tym miejscu recenzji dodatkowo podkreślić, że mam duże uznanie dla inwencji Doktorantki w odniesieniu do merytorycznie poprawnego wyboru i zastosowania metod laboratoryjnych przy realizacji określonych celów badawczych. Mogę zatem stwierdzić, że pod względem metodologicznym uzyskane wyniki w rozprawie nie budzą wątpliwości i pozwalają w oparciu o nie na właściwe interpretacje odnośnie toksycznego działania grzyba *C. coronatus* i powodowanych przez jego dwa metabolity - alkohol benzylowy i dodekanol efektów na poziomie biochemicznym, komórkowym, tkankowym i całego organizmu owada.

Z przeprowadzonych kombinacji eksperymentalnych Doktorantka uzyskała dużą ilość danych i część wynikowa rozprawy stanowi rzeczywiście dużą dawkę nowych informacji dla czytelnika. Zamieszczone dane w formie wykresów zostały poprawnie opracowane, nie zawierają elementów zbędnych i są czytelne, a w legendach pod wykresami znajdują się wszystkie potrzebne informacje dla pełnego zrozumienia prezentowanych zależności bez konieczności cofania się i zaglądania w tym celu do wcześniejszego rozdziału metodycznego. Mgr Michalina Kazełk opisała skrupulatnie uzyskane wyniki badań, przedstawiając rodzaj występujących zmian w poszczególnych analizowanych parametrach i zależnościach.

Przy interpretacji uzyskanych wyników badań w rozdziale Dyskusji oraz formułowaniu bardziej ogólnych wniosków Autorka rozprawy wykazała dużą rozwagę, jak i znajomość danych literaturowych. Dyskusja została przeprowadzona poprawnie pod względem

merytorycznym, tak przy interpretacji szczegółowych wyników badań, jak i ogólnym formułowaniu wniosków.

W końcowych dwóch rozdziałach rozprawy Doktorantka dokonała syntetycznego podsumowania całości wykonanych badań i wyciągnęła szereg prawidłowych pod względem merytorycznym wniosków, popartych odpowiednimi dowodami, które nie wybiegają poza otrzymane dane eksperymentalne. Za najważniejsze osiągnięcia uzyskane przez mgr Michalinę Kazełkę w przedstawionej rozprawie uważam:

1. Wykrycie na podstawie biotestów toksykologicznych *in vivo* dwóch metabolitów od *C. coronatus* - alkoholu benzyłowego i dodekanolu o wysokiej aktywności owadobójczej i ustalenie ich selektywności działania w zależności od gatunku i stadium rozwojowego much *C. vicina* i *C. vomitoria*. Wynik ten jest szczególnie godny uwagi dlatego, że uzyskano go na podstawie biotestu z wykorzystaniem tak dużej liczby aż 77 metabolitów.

2. Wykazanie powodowanych przez alkohol benzyłowy i dodekanol zmian jakościowych i ilościowych w składzie wolnych kwasów tłuszczowych na powierzchni kutikuli larw i osobników dorosłych *G. mellonella* i *C. vicina*, co sugeruje potencjalne możliwości topikalnej aplikacji tych związków nie tylko w dalszych badaniach, ale również w praktyce.

3. Stwierdzenie specyfiki toksycznego charakteru działania alkoholu benzyłowego na ciało tłuszczowe larw *G. mellonella*, charakteryzującego się rozpadem tej tkanki. Doktorantka tym doświadczeniem wykazała, że alkohol benzyłowy dociera po aplikacji topikalnej w głąb ciała larw aż do tej tkanki, pełniąc ważną funkcję troficzną, detoksykacyjną i biosyntetyczną u owadów. Autorka dowiodła zarazem, że działanie toksyczne tego alkoholu ma charakter pleiotropowy.

4. Wykrycie odmiennego mechanizmu hemocytotoksycznego działania obu metabolitów u *G. mellonella* i *C. vicina* w wyniku, którego immunokompetentne komórki – hemocyty kierowane są na szlak nekrozy, tak w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*, co sugeruje, że związki te poprzez hemocel mogą docierać wraz z hemolimfą do innych tkanek i narządów.

5. Udowodnienie, że oba metabolity w istotny, choć zróżnicowany sposób, zaburzają homeostazę fizjologiczną w hemolimfie larw *G. mellonella*, indukując zmiany w aktywności

enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym i modyfikując poziom końcowego produktu peroksydacji lipidów - dialdehydu malonowego (MDA) w tej tkance.

W przygotowanym tekście pracy Doktorantka nie uniknęła jednak drobnych niedociągnięć, co z obowiązku recenzenta chciałbym w tym miejscu wskazać i przedyskutować podczas obrony rozprawy.

- w legendzie pod ryciną 1, dodatkowego uzupełnienia wymagają naniesione na przedstawionym schemacie oznaczenia cyfrowe 6 i 7,
- na str. 22 w.1 od góry fragment zapisanego zdania „...ciało tłuszczowe (odpowiednik wątroby u ssaków)... sugeruję zmienić na „ ciało tłuszczowe (odpowiednik wątroby i tkanki tłuszczowej)...”. Badania ostatnich lat dowodzą, że pod względem funkcjonalnym duże podobieństwo do wątroby ssaka wykazują także oenocyty owadów,
- w tytule podrozdziału 5.5 oraz w Spisie Treści i na str. 52 sugeruję usunięcie akronimu GM/MS, ponieważ poprzedzający go zapis jest w pełni wystarczający pod względem informacyjnym,
- na str. 55 w.5 od góry sugeruję zmianę zapisanego sformułowania „W celu znarkotyzowania owady...” na „W celu anestezji owady...” Odnośnie tego zdania proszę też o wyjaśnienie dlaczego lawy *G. mellonella* kilka razy zanurzano w wodzie i jak długo była wykonywana ta czynność?,
- w nagłówku tabeli 3 na str. 67 oraz na str. 130 w.12 od góry i w. 4 od dołu zapisany jest skrót „...CAS...”. Proszę o wyjaśnienie co ten skrót oznacza, ponieważ takiego wyjaśnienia brak w Spisie Skrótów,
- Tabela 4 zawiera dane o aktywności owadobójczej 77 metabolitów grzyba *C. coronatus* u larw i dorosłych much *C. vicina* i *C. vomitoria*, a tabela 5 dane odnośnie wpływu tych związków na długość trwania rozwoju larw obu gatunków much. W związku z tymi wynikami proszę o wyjaśnienie następujących kwestii: (1) czy zamieszczone dane w tab. 5 wyrażone są w dniach, a jeśli tak to, w którym stadium larwalnym (czy w L3 ?) i w jakiej fazie rozwoju w tym stadium (w fazie obligatoryjnego czy fakultatywnego żeru ?) podawano larwom badane związki. W Materiałach i Metodach nie zostały podane te informacje. (2) czy dane dotyczące śmiertelności larw odnoszą się do ostatniego

stadium rozwojowego? (3) czy przy ocenie śmiertelności u dorosłych much testowane związki aplikowano zaraz po linieniu imaginalnym? (4) w tekście na str. 72 podana jest informacja, że alkohol benzyłowy i dodekanol opóźniały proces wylinki imaginalnej u *C. vivina*, a brak było wpływu tych związków na proces przepoczwarczania u *C. vomitoria*. Proszę o wyjaśnienie czy obserwacje te odnoszą się do much, które rozwinęły się z traktowanych wcześniej testowanymi związkami poczwerek czy larw?,

- pod rycinami 16 – 18 sugeruję podanie poziomu istotności statystycznej „p”, dla otrzymanych danych,
- na str. 136 w.6-9 w zapisanym fragmencie tekstu „Hemocyty również aktywnie uczestniczą w homeostazie owadów poprzez regulowanie stężenia różnych substancji w hemolimfie. Są głównym organem metabolizmu pośredniego owada”. Jak mam rozumieć ten fragment tekstu? Czy jednak ta charakterystyka nie odnosi się do funkcji ciała tłuszczowego?,
- na str.138 w.17 od góry należy skorygować zapis „(II typ śmierci komórkowej)” na „(I typ śmierci komórkowej)”,

Podczas czytania rozprawy zauważyłem także pewne pomyłki literowe czy drobne niedociągnięcia redakcyjne dotyczące cytowanej literatury, które wymagają korekty.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Mgr Michalina Kazek wyciągnęła szereg wniosków z przeprowadzonych badań, które są poparte dowodami eksperymentalnymi i w mojej ocenie stanowią wyczerpujące odpowiedzi na postawione wcześniej hipotezy i pytania. Uważam, że wnioski są merytorycznie poprawne, sformułowane zostały klarownie i nie wykraczają poza stwierdzone fakty doświadczalne i zawierają elementy interpretacyjne, co szerzej uwzględniono w Streszczeniu rozprawy.

Pragnę w tym miejscu podkreślić, że wyszczególnione wcześniej przez mnie drobne niedociągnięcia w ocenianej rozprawie nie zmieniają interpretacji wyników ani wyprowadzonych z nich wniosków. Są natury technicznej, redakcyjnej, sugerują pewne uzupełnienia, odnoszą się do bardziej precyzyjnego zapisania niektórych fragmentów tekstu w pracy, jednak nie pomniejszają wartości merytorycznej rozprawy i można je łatwo poprawić podczas przygotowania całości pracy lub jej części do druku. Chciałbym zatem stwierdzić, że



przedstawiona rozprawa stanowi wartościowe opracowanie i dostarcza szeregu nowych danych dotyczących selektywności gatunkowej i specyfiki tkankowej toksycznego działania entomopatogenicznego grzyba *C. coronatus* i jego dwóch najbardziej aktywnych metabolitów - alkoholu benzylowego i dodekanolu u modelowych gatunków owadów.

Pod względem merytorycznym oceniana rozprawa jest pierwszym tego typu kompleksowym opracowaniem w zakresie toksykologicznego działania obu metabolitów grzyba *C. coronatus* na poziomie biochemicznym, komórkowym, tkankowym i całego organizmu owada. Uzyskane wyniki w tej pracy są wartościowe nie tylko dlatego, że mogą stanowić punkt wyjścia do podjęcia dalszych badań zależności struktura – aktywność w celu otrzymania jeszcze bardziej aktywnych i specyficznie działających analogów obu metabolitów, ale również dlatego, że wskazują na możliwość potencjalnego zastosowania tych związków przy opracowywaniu alternatywnej metody zwalczania szkodliwych owadów.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie o Stopniach i Tytule Naukowym i daje podstawy merytoryczne do ubiegania się o stopień doktora nauk przyrodniczych. Dlatego wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Michaliny Kazeł do dalszych etapów przewodu doktorskiego i jednocześnie wnoszę o wyróżnienie Jej rozprawy stosowną nagrodą, co uzasadniłem w oddzielnie dołączonym wniosku.

Prof. dr hab. Grzegorz Rosiński

Poznań, dnia 25.09.2017



Poznań, dnia 25 września 2017 r.

**Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie nagrodą rozprawy doktorskiej
mgr Michaliny Kazek**

Do zgłoszenia wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Michaliny Kazek motywowało mnie kilka względów. Oceniana rozprawa pod względem merytorycznym wnosi przede wszystkim szereg nowych danych do naszej wiedzy odnośnie selektywności gatunkowej i specyfiki fizjologicznej mechanizmów toksycznego działania dwóch aktywnych metabolitów entomopatogenicznego grzyba *Conidiobolus coronatus* – alkoholu benzyłowego i dodekanolu u wybranych gatunków modelowych owadów. Jest to jedno z nielicznych dotąd tak kompleksowych opracowań pokazujących szerokie spektrum zmian wywołanych przez oba związki w funkcjach systemów obronnych owada na poziomie tkankowym, komórkowym i biochemicznym. Uzyskane dane w tej pracy są wartościowe nie tylko dlatego, że mogą stanowić punkt wyjścia do podjęcia dalszych badań nad poszukiwaniem bardziej aktywnych i specyficznie działających syntetycznych agonistów obu metabolitów, ale także dlatego, że mogą zostać wykorzystane przy opracowywaniu nowych preparatów do zwalczania szkodliwych owadów.

Mając na uwadze wartość merytoryczną uzyskanych wyników w prezentowanej rozprawie, jak i zawarty element innowacyjności w tej pracy oraz potencjalne znaczenie praktyczne wykonanych badań, proszę Wysoką Radę Naukową Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk o wyróżnienie rozprawy mgr Michaliny Kazek stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Grzegorz Rosiński